

*На правах рукописи*



**СИНЯВСКАЯ**  
**Анна Максимовна**

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ЛЁГКИХ МЫШЕЙ С БЦЖ-  
ГРАНУЛЕМАТОЗОМ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ  
ИЗОНИАЗИДА**

**1.5.22 – клеточная биология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата медицинских наук**

**НОВОСИБИРСК – 2023**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ) (Новосибирск)

**Научный руководитель:**

академик РАН, профессор,  
доктор медицинских наук

**Шкурупий Вячеслав Алексеевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией технологий управления здоровьем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

**Морозов Виталий Валерьевич**

доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Шварц Яков Шмульевич**

**Ведущая организация:**

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Проспект Академика Лаврентьева, д.10, 630090, тел.: +7 (383) 333-64-09.

Защита состоится «03» октября 2023 г. в 10 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.242.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117.

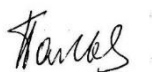
Тел./факс: 8(383) 333-64-56.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Автореферат диссертации разослан «  »            2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Пальчикова Н.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Туберкулёз является одним из самых распространённых и опасных инфекционных заболеваний, которое входит в десять ведущих причин смерти в мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2020 год, в мире ежегодно заболевают туберкулёзом до 10 миллионов человек, из них около 1,5 миллионов человек умирают (Global tuberculosis report 2021. WHO). В России, начиная с 2000 года, уровень заболеваемости туберкулёзом стабильно падает (с 90,4 случаев на 100 000 населения в 2000 году до 41,1 в 2019 году). Однако показатели заболеваемости и смертности остаются на высоком уровне (Сюнякова Д.А., 2021).

В настоящее время основным способом лечения туберкулёза является антибиотикотерапия (Фтизиатрия, под ред. П. К. Яблонского, 2018, Захарочкина Е.Р., 2013). Такая терапия достаточно эффективна, но из-за особенностей туберкулёзного воспаления, обусловленных персистенцией микобактериальной инфекции в гранулёмах, она имеет ряд ограничений и побочных эффектов. Туберкулёзные гранулёмы - специфичные скопления макрофагов с очагом казеозного некроза в центре (Paige C., 2010, Pagan A.J., 2015). Роль гранулём в течении болезни неоднозначна. С одной стороны, макрофаги таким образом эффективно изолируют возбудителя, а с другой – в отсутствие микроциркуляции ограничены возможности доставки лекарства к микобактерии в гранулёме (Montes-Worboys A., 2010; Grobler A., 2016). Противотуберкулёзные средства ограничено проникают в места наибольшего скопления микобактерий – внутрь гранулём (Kjellsson M.C., 2012). Показано, что большинство противотуберкулёзных препаратов плохо проникают и в очаги некроза (Lopez-Varela E. et al., 2022). Кроме того, что в крупных гранулёмах не достигается эффективная концентрация лекарств, а субтерапевтические дозы могут способствовать развитию лекарственной устойчивости микобактерий (Dheda K. et al., 2018).

В основе базовой терапии, с которой начинают лечение до получения результатов анализов на чувствительность к антибиотикам, лежит прием гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК). Изониазид – самый эффективный из препаратов ГИНК для лечения активного туберкулёза. Однако применение изониазида сопровождается значительным количеством побочных эффектов: токсическое поражение нервной системы, гепатотоксичность вплоть до лекарственного гепатита, раздражение ЖКТ, сыпь, лихорадка и тд (Фисенко В., 2006; Lei S., 2021). Исследования указывают на связь лекарственного поражения печени с развитием фиброза (Ким Л.Б. и др.; 2020, Biswas A. et al., 2020). Самой частой формой (до 85%) заболевания является лёгочный туберкулёз и для создания бактерицидных концентраций препарата в ткани лёгких необходима его высокая концентрация в крови, что сопряжено с большим количеством системных побочных эффектов.

Из-за нежелательных эффектов лекарств и длительности лечения значительная часть пациентов не заканчивают курсы терапии или принимают лекарства

нерегулярно, что приводит к полной или частичной неэффективности терапии и развитию рецидивов инфекции (Kempker et al. 2015; Pradipta, Ivan Surya et al., 2018). Неполное или нерегулярное лечение также приводит к развитию форм туберкулёза с лекарственной устойчивостью (Pasipanodya et al., 2012; Dheda et al., 2017).

Имеющиеся данные указывают на необходимость дальнейшего усовершенствования химиотерапии имеющимися и новыми противотуберкулёзными препаратами, при назначении которых необходимо предусматривать оптимальный вариант их введения с тем, чтобы создать необходимую концентрацию непосредственно в очаге поражения. При этом адресная доставка препарата непосредственно к очагу воспаления в меньших количествах может снижать выраженность побочных эффектов без ухудшения лечебной эффективности.

**Степень разработанности темы исследования.** Для продления действия изониазида и целенаправленной доставки антибиотика к микобактериям в центр гранулёмы, снижения эффективной дозы лекарственного препарата, была разработана фармацевтическая композиция изониазида с окисленным декстраном – декстразид (Шкурупий В.А., 2002; Шкурупий В.А., 2009). Окисленный декстран сам по себе обладает иммуностимулирующим действием, преимущественно на клеточное звено иммунитета, антифибротическим, гепатопротекторным, потивовоспалительным и интерферон-индуцирующим действиями (Шкурупий В.А., 2006). Помимо непосредственно бактерицидного эффекта изониазида было показано, что окисленный декстран может активировать макрофаги и стимулировать фагосомно-лизосомное слияние, преодолевая незавершенный фагоцитоз при туберкулёзе (Шкурупий, В. А., 2007). Было показано, что применение декстразида по сравнению с изониазидом сопровождается меньшими дистрофическими и деструктивными изменениями в органах (Жарков А.С., 2013; Жарков А.С., 2016). С этими данными согласуются результаты исследования гетерополисахаридов фукоиданов как носителей для адресной доставки терапевтических агентов, таких как доксорубицин, противотуберкулёзные препараты и т.д. (Супрунчук В.Е., Денисова Е.В., 2019). Такие системы обладают низкой токсичностью и биodeградируемы.

Перспективным направлением является также создание нанолипосомальных форм контейнерной доставки в клетки-мишени иммобилизованных на окисленном декстране антимикробных лекарственных препаратов. Такие комбинированные фармакологические конструкции, содержащие иммобилизованные на окисленном декстране антимикробные лекарственные препараты, которые размещены как внутри, так и вне нанолипосомальных контейнеров, могут оказывать комбинированное антимикробное действие за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза (Шкурупий В.А., 2019).

В этой связи следующим этапом разработки противотуберкулёзных препаратов стало помещение декстразида внутрь липосом (Шкурупий В.А., 2016). Липосомы являются наиболее изученными «транспортными средствами» за счёт их способности локализоваться в определённых типах клеток (Salem I. I. et al., 2005). Одним из преимуществ препаратов, инкапсулированных в липосомах, является значительное

снижение токсичности (Khuller G. K. et al., 2004). Однако противотуберкулёзные эффекты липосомальной формы декстразида изучены недостаточно, особенно на длительных сроках после ее введения. Были проведены только краткосрочные эксперименты с интраперитонеальным введением липосомальной формы декстразида (Шкурупий В.А., 2019), и отсутствуют сведения о лечебных эффектах при ее ингаляционном введении.

Все сказанное послужило основанием для постановки цели и задач диссертационного исследования.

**Цель исследования:** провести сравнительное изучение на клеточном уровне влияния различных композиций изониазида с окисленным декстраном при их интраперитонеальном и ингаляционном введении на БЦЖ-индуцированное гранулематозное воспаление.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать влияние различных композиций изониазида с окисленным декстраном на элиминацию микобактерий туберкулёза из паренхимы печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом на длительных сроках введения.

2. Изучить морфологические изменения паренхимы печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении различных композиций изониазида с окисленным декстраном на длительных сроках введения.

3. Охарактеризовать процессы воспаления и деструкции в паренхиме печени и легких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении различных композиций изониазида с окисленным декстраном на длительных сроках введения.

4. Изучить реорганизацию соединительной ткани печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении различных композиций изониазида с окисленным декстраном на длительных сроках введения.

**Научная новизна исследования.**

1. Впервые показано, что липосомальная форма декстразида при ее интраперитонеальном введении более эффективно, чем изониазид или декстразид, уничтожает персистирующие микобактерии и элиминирует гранулёмы из легких и печени мышей с БЦЖ-гранулематозом, оказывает значительно менее выраженные провоспалительные, токсические и профибротические эффекты.

2. Впервые показано, что при ингаляционном введении липосомальная форма декстразида более эффективно уничтожает микобактерии, персистирующие в лёгких, чем при ее интраперитонеальном введении, однако проявляет при этом сходную эффективность в отношении микобактерий в печени; уровни провоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ 1 и 9, объём деструктивных изменений в легких и печени, а также активность процессов фиброобразования при разных способах введения остаются сходными.

3. Доказано, что ингаляционное введение липосомальной формы декстразида оказывает сравнимые с интраперитонеальным введением системные эффекты, что позволяет впервые говорить о возможности существенно упростить доставку антибиотика в очаг инфекции, расположенный вне лёгких.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Обобщённая оценка выраженности элиминации микобактерий, снижения токсичности и профибротического действия, активности процессов воспаления, позволила расположить изониазид и его композиции с окисленным декстраном в порядке нарастания эффективности воздействия на указанные процессы следующим образом: изониазид, декстразид, липосомальная форма декстразида с интраперитонеальным введением, липосомальная форма декстразида с ингаляционным введением.

Полученные на клеточном уровне результаты доказывают, что композиции изониазида с окисленным декстраном обладают более высокой лечебной эффективностью, чем оригинальный препарат изониазид, особенно ее липосомальная форма, что дает основания для проведения доклинических, а в дальнейшем и клинических исследований этих композиций в качестве противотуберкулёзных препаратов.

**Методология и методы исследования:** методология исследования базируется на применении принципов и методов комплексного патоморфологического анализа на клеточном уровне, позволяющего установить особенности структурной реорганизации печени и лёгких мышей при БЦЖ-гранулематозе. Используются современные методы комплексного морфологического анализа (световая микроскопия, иммуногистохимические исследования, морфометрический анализ) и адекватные методы статистического анализа. Объект исследований – образцы печени и лёгких мышей после введения вакцины БЦЖ и развития БЦЖ-гранулематоза; предмет исследования – структурная и клеточная реакция печени и лёгких мышей при хронической микобактериальной инфекции без влияния и при введении различных композиций изониазида с окисленным декстраном.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. В цитоплазме макрофагов легких и печени через 5 месяцев после заражения БЦЖ обнаружены МБТ; макрофаги объединены в гранулёмы - плотно сгруппированные крупные эпителиоидные клетки с объемной цитоплазмой, заполненной МБТ; гистологическая и цитологическая картина БЦЖ-гранулематоза сходна с такой при туберкулёзе у человека. Через 2 месяца после начала введения изониазида и композиций изониазида с окисленным декстраном снизилось общее количество МБТ в лёгких и печени, объемная и численная плотность гранулём; диаметр гранулём по сравнению с группой без лечения уменьшился после введения липосомальной формы декстразида только в легких вне зависимости от способа введения. Через 6 месяцев введения изониазида и композиций изониазида с окисленным декстраном в паренхиме лёгких всех групп мышей МБТ не обнаружено, в печени – отмечено дальнейшее снижение величин показателей относительно 2-х месяцев введения препаратов.

2. Через 5 месяцев после заражения в цитоплазме макрофагов гранулём и клеток паренхимы лёгких и печени выявлена экспрессия провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- $\alpha$ , а также матриксных металлопротеиназ (ММП) 1 и 9. В лёгких и печени через 2 и 6 месяцев после начала введения изониазида и его

композиций с окисленным декстраном наибольшее количество инфильтратов и провоспалительных цитокинов обнаружили у мышей в группе без лечения и в группе, получавшей изониазид; уровни провоспалительных цитокинов и MMP1 и 9 оказались минимальными в группах мышей, получавших липосомальную форму декстразида. Уровень ингибитора матриксной металлопротеиназы 1 (TIMP1) во всех группах обратно коррелировал с уровнем MMP1.

3. Через 5 месяцев после заражения в паренхиме лёгких и печени отмечены деструктивные изменения, вокруг и внутри гранулём наблюдается периферический фиброз в виде коллагеновых и ретикулярных волокон. В лёгких количество коллагеновых волокон в группах мышей, получавших 2 и 6 месяцев изониазид, возрастает относительно группы мышей без лечения и снижается после введения композиций с окисленным декстраном. В печени количество ретикулярных волокон в группах мышей, получавших 2 и 6 месяцев изониазид, возрастает относительно группы мышей без лечения и снижается после введения мышам композиций с окисленным декстраном; количество коллагеновых и ретикулярных волокон минимально в группах мышей, получавших липосомальную форму декстразида вне зависимости от способа введения.

**Апробация результатов исследования.** Результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, обсуждены на: VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, Россия, 2018); III Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» (Новосибирск, Россия, 2018); Девятой Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, Россия, 2020); VI съезде Российского общества патологоанатомов, (Новосибирск, Россия, 2022); XIV Российской научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2023».

**Публикации по теме диссертации.** По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, из них 3 статьи в отечественных рецензируемых журналах из списка ВАК и индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы; главы, посвященной описанию материала и методов исследования; главы собственных результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Материал диссертации изложен на 156 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 10 микрофотографий. Список цитированной литературы включает 48 отечественных и 223 иностранных источника.

**Личный вклад соискателя.** Автором проведен анализ научно-медицинской литературы по изучаемой проблеме и написан литературный обзор. Автор лично выполнял забор органов для исследования, их гистологическую обработку,

изготовление парафиновых срезов и дальнейшее окрашивание срезов гематоксилин-эозином, по Ван-Гизон, импрегнацией серебром, иммуногистохимические окраски и последующий морфометрический анализ. Самостоятельно проведена статистическая обработка полученных результатов, написаны все разделы диссертационной работы. Автор участвовал в подготовке публикаций по материалам исследования.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа выполнена на 105 мышах-самцах линии BALB/c с массой тела 19-22 гр., полученных из питомника ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Животных содержали в хорошо вентилируемом, отапливаемом помещении на стандартной неограниченной диете со свободным доступом к воде с естественным световым режимом. Эксперименты выполнены в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н). Мыши были разделены на 7 групп по 15 особей в каждой:

- 1 группа – инфицированные БЦЖ;
- 2 группа – инфицированные БЦЖ с интраперитонеальным введением раствора NaCl в режиме препаратов.
- 3 группа – инфицированные БЦЖ с введением изониазида интраперитонеально;
- 4 группа – инфицированные БЦЖ с введением декстразида интраперитонеально;
- 5 группа – инфицированные БЦЖ с интраперитонеальным введением липосомальной формы декстразида (ЛФД);
- 6 группа – инфицированные БЦЖ с ингаляционным введением ЛФД,
- 7 группа – интактные мыши.

В работе была использована модель БЦЖ-гранулематоза. Мышей инфицировали путем ретроорбитального введения 0,5 мг микробных тел – микобактерий туберкулёза из вакцины БЦЖ на 1 животное в 0,2 мл 0,85% водного раствора NaCl. Спустя 3 месяца после инфицирования мышам начинали вводить различные фармацевтические композиции 2 раза в неделю в течение 6 месяцев. Доза по изониазиду всех фармацевтических композиций составила 14 мг/кг массы тела. Все использованные фармацевтические композиции перед введением разводили дистиллированной водой до получения объема 0,0025 мл/1 г массы тела.

Для изучения лечебного влияния на модели БЦЖ-гранулематоза были выбраны следующие фармацевтические композиции:

- изониазид, стандартный в настоящее время лекарственный препарат для лечения туберкулёза; в работе использовали изониазид производства «Fluka Analytical»;

- декстразид. ранее были проведены успешные исследования, показавшие эффективность декстразида в элиминации БЦЖ-гранулематоза в сравнении с изониазидом, однако не были изучены его антимикобактериальные свойства и токсические эффекты в течение длительного времени; в работе использовали декстразид, изготовленный по технологии, описанной в патенте RU № 2618341 (Шкурупий В.А., 2016);



- липосомальная форма декстразида (ЛФД), ранее не проводили исследований эффектов липосомальной формы декстразида при БЦЖ-гранулематозе; впервые исследована ингаляционная форма ЛФД, её действие на персистирующие в тканях микобактерии и выраженность ее токсических эффектов; ЛФД для работы была изготовлена и любезно предоставлена Троицким А.В. и Быстровой Т.Н. (патент RU № 2372914).

Сбор биологических образцов проводили через два и шесть месяцев после начала введения препаратов.

Изониазид, декстразид и ЛФД вводили интраперитонеально, Интраперитонеальный способ введения был выбран как приближенный по эффекту к внутривенному, но технически гораздо проще осуществимый. Кроме того, ЛФД также вводили ингаляционно для оценки эффективности данного способа введения. Доза ЛФД при ингаляционном введении была такой же, как и при интраперитонеальном введении. Использовали камеру с ультразвуковым ингалятором «Муссон» при комнатной температуре. Мышей извлекали из камеры сразу после испарения ингалируемой ЛФД. Животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом.

Печень и лёгкие мышей фиксировали сразу после извлечения в 10% изотоническом водном растворе формалина с последующей стандартной гистологической обработкой образцов органа. Иммуногистохимическую окраску срезов производили в ручном режиме.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 12.0 (StatSoft, США). Для оценки межгрупповых различий использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса для множественного сравнения, при обнаружении статистически значимых различий между группами далее проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна-Уитни. Результаты представлены как средняя величина показателя и его средноквадратичное отклонение ( $M \pm SD$ ). Вероятность справедливости нулевой гипотезы ( $p$ ) принимали при 5% уровне значимости ( $p < 0,05$ ).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Объемная плотность *M. tuberculosis*, диаметр, численная и объемная плотность гранулём в легких и печени мышей с БЦЖ-гранулематозом после введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном.**

В цитоплазме макрофагов легких и печени через 5 месяцев после заражения БЦЖ во всех группах обнаружены МБТ (рис. 1-4). В лёгких гранулёмы располагались преимущественно перибронхиально, а в печени – перипортально. Микобактерии находились внутри свободных макрофагов и внутри макрофагов гранулём. Гранулёмы состояли из плотно сгруппированных крупных эпителиоидных клеток с объемной цитоплазмой, заполненной МБТ, отдельных фибробластов. Наблюдаемая

гистологическая и цитологическая картина БЦЖ-гранулематоза сходна с такой при туберкулёзе у человека (Ramakrishnan L., 2012).

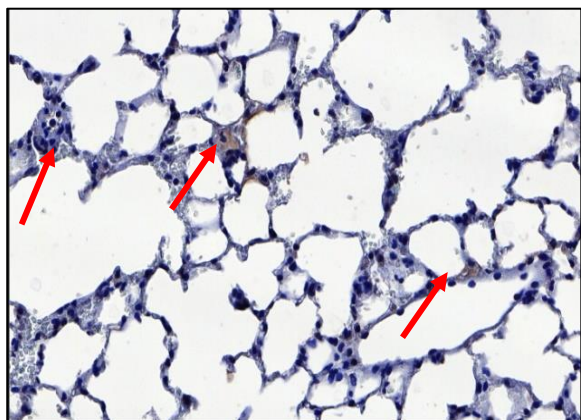


Рис.1. Увеличение x200. Лёгкие, 5 мес. заражения. Окраска ИГХ на МБТ. Микобактерии в макрофагах (стрелки). 2 группа (зараженные БЦЖ, с введением NaCl).

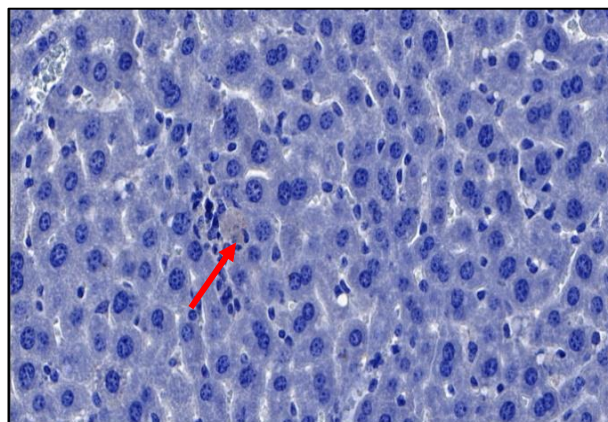


Рис.2. Увеличение x200. Печень, 5 мес. заражения. Окраска ИГХ на МБТ. Микобактерии в макрофагах (стрелки). 2 группа (зараженные БЦЖ, с введением NaCl).

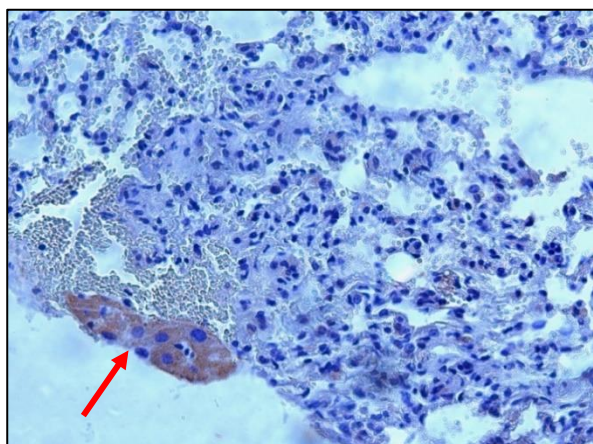


Рис.3. Увеличение x200. Лёгкие, 5 мес. заражения. Окраска ИГХ на МБТ. Микобактерии в гранулёмах (стрелка). 2 группа (зараженные БЦЖ, с введением NaCl).

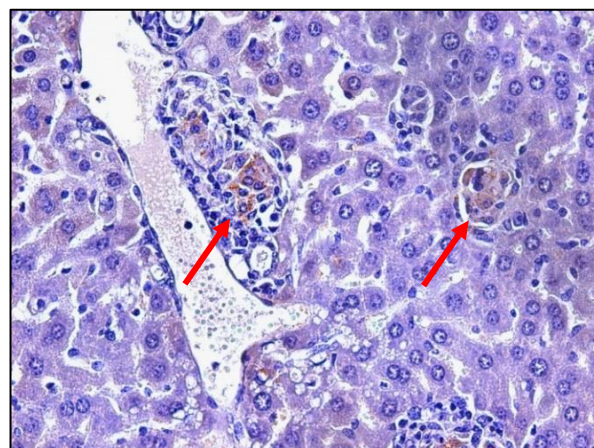


Рис.4. Увеличение x200. Печень, 5 мес. заражения. Окраска ИГХ на МБТ. Микобактерии в гранулёмах (стрелка). 2 группа (зараженные БЦЖ, с введением NaCl).

В лёгких через 2 месяца после начала введения мышам с БЦЖ-гранулематозом изониазида и его композиций с окисленным декстраном выявлено влияние всех этих соединений на элиминацию микобактерий, уменьшение диаметра, численной и объемной плотности гранулём (рис. 5). Наиболее выраженный эффект был отмечен по снижению количества микобактерий в свободных макрофагах, максимально – в группе, получавшей ЛФД ингаляционно. Активность уменьшения численной плотности гранулём и количества микобактерий в гранулёмах не зависело от вида соединения, в то же время диаметр и объемная плотность гранулём снижались в большей степени при ингаляционном введении ЛФД.

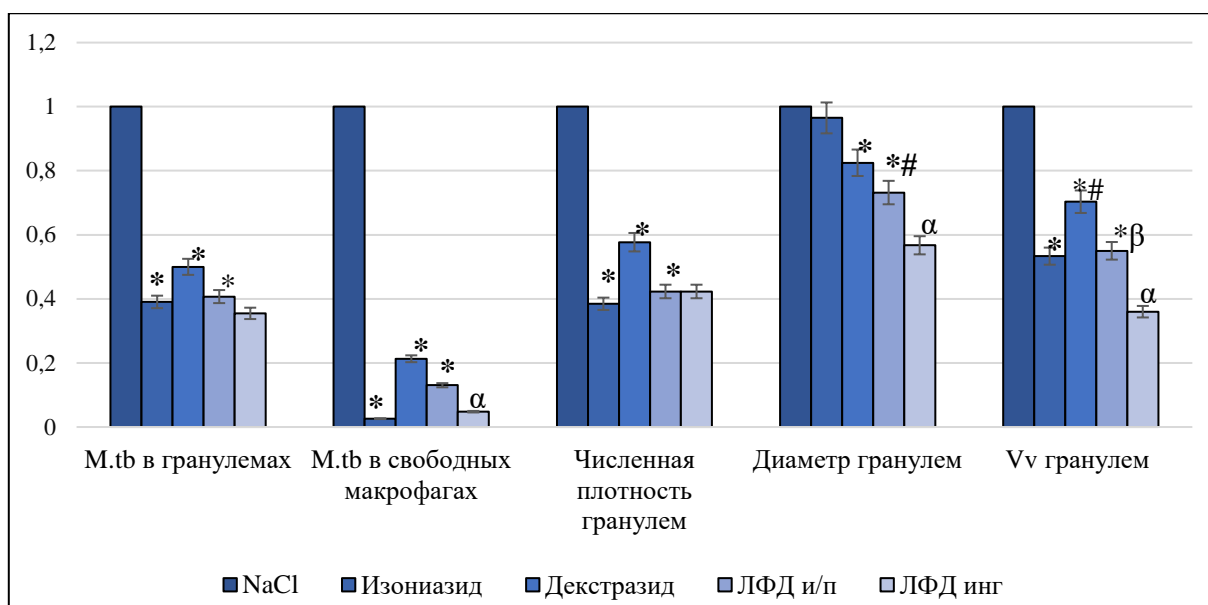


Рис 5. Объемная плотность микобактерий в гранулёмах и свободных макрофагах, диаметр, численная и объемная плотность гранулём в лёгких после 2 месяцев введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном.

Примечание. Результаты представлены в виде доли от величины показателя в группе с введением NaCl, принятой за единицу; Vv – объемная плотность. \* – достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших NaCl, # - достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших изониазид;  $\beta$  - достоверные различия между группами мышей, получавших декстразид и ЛФД;  $\alpha$ - достоверные различия между группами мышей, получавших ЛФД интраперитонеально и ингаляционно.

Через 6 месяцев после начала введения соединений изониазида в паренхиме лёгких мышей всех групп экспериментальных животных МБТ и гранулёмы не были определены.

Через 2 месяца после начала введения мышам с БЦЖ-гранулематозом изониазида и его композиций с окисленным декстраном уменьшались общее количество микобактерий в печени, объемная и численная плотность гранулём (рис. 6). Минимальное общее количество микобактерий было обнаружено в группах, получавших ЛФД при обоих способах введения. Диаметр гранулём по сравнению с группой контроля значимо не различался между группами, а численная и объемная плотность гранулём были минимальными в группе мышей, получавших ЛФД ингаляционно.

В печени мышей с БЦЖ-гранулематозом через 6 месяцев после начала введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном микобактерии в свободных макрофагах не определялись; в гранулёмах отмечено дальнейшее снижение их количества относительно 2-х месяцев введения. Величины численной плотности, диаметра и объемной плотности гранулём также продолжали снижаться, а минимальные значения данных параметров были определены в группах мышей, получавших ЛФД различными способами.

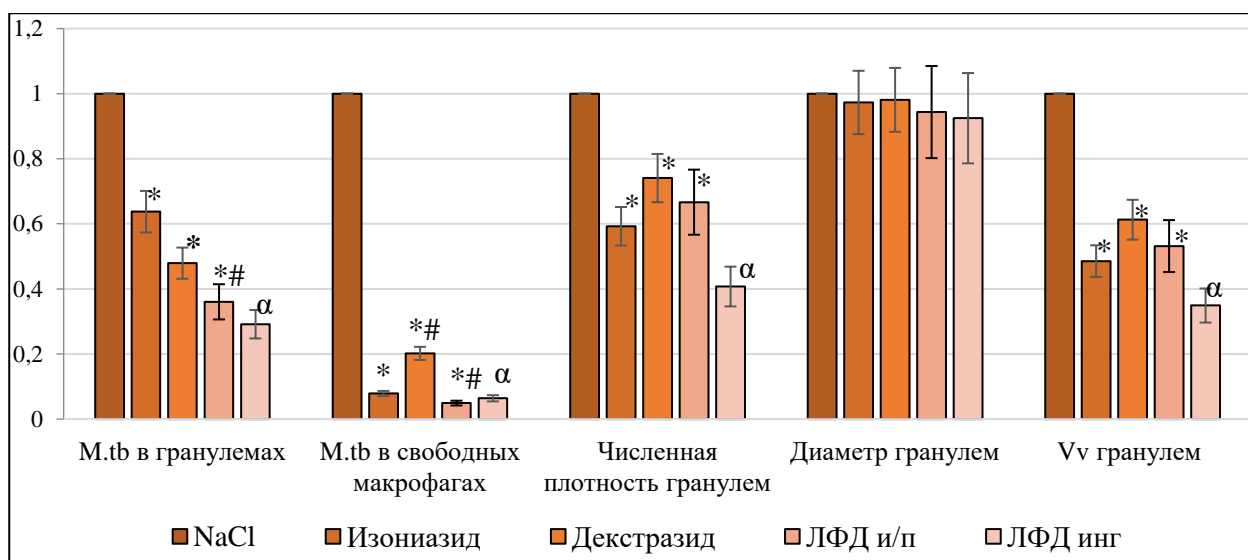


Рис. 6. Объемная плотность микобактерий в гранулёмах и свободных макрофагах, диаметр, численная и объемная плотность гранулём в лёгких после 2 месяцев введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном.

Примечание. Результаты представлены в виде доли от величины показателя в группе с введением NaCl, принятой за единицу; Vv – объемная плотность. \* – достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших NaCl, # - достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших изониазид; β - достоверные различия между группами мышей, получавших декстразид и ЛФД; α- достоверные различия между группами мышей, получавших ЛФД интраперитонеально и ингаляционно.

Таким образом, в проведенном исследовании показано, что среди всех групп мышей, получавших разные формы изониазида, наиболее эффективно элиминировались МБТ из свободных макрофагов и уменьшалась объемная плотность гранулём при введении ЛФД. В лёгких применение ЛФД максимально уменьшало диаметр гранулём, а в печени – численную плотность гранулём. Можно предполагать, что эти эффекты могут быть связаны с активным захватом ЛФД макрофагами и пролонгированным действием данной формы изониазида по сравнению со стандартным препаратом.

### **Объемная плотность инфильтратов, уровни IL-6, TNF-α, матриксных металлопротеиназ MMP1 и 9 в лёгких и печени мышей с БЦЖ-гранулематозом после введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном.**

В работе было исследовано количество провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α в паренхиме лёгких и печени. Активированные заражением МБТ макрофаги и гибнущие клетки активно секретируют провоспалительные цитокины, которые привлекают в очаг воспаления еще большее количество лейкоцитов и вызывают перестройку жизнедеятельности соседних клеток (Marakalala et al., 2016). Провоспалительные цитокины, поддерживая активное воспаление, привлекают в область гранулёмы новые иммунные клетки, активируют Т-клеточное звено иммунитета, индуцируют активность по уничтожению патогенов (Clay H., 2008).

Хотя высокий уровень провоспалительных цитокинов, выделяемых активированными макрофагами, обеспечивает создание и рост гранулём в паренхиме легких, чрезмерное производство может быть пагубно для организма, увеличивая

деструктивные изменения в тканях (Rosa F. J., 2013). Уровни цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-6 в паренхиме лёгких оказались прямо связанными с уровнем деструктивных нарушений; после 2 месяцев введения препаратов максимальное значение данного параметра в лёгких мышей среди групп, получавших разные формы декстразида, наблюдалось у мышей, получавших изониазид, а минимальное – в группах мышей, получавших ЛФД различными способами (рис. 7-10).

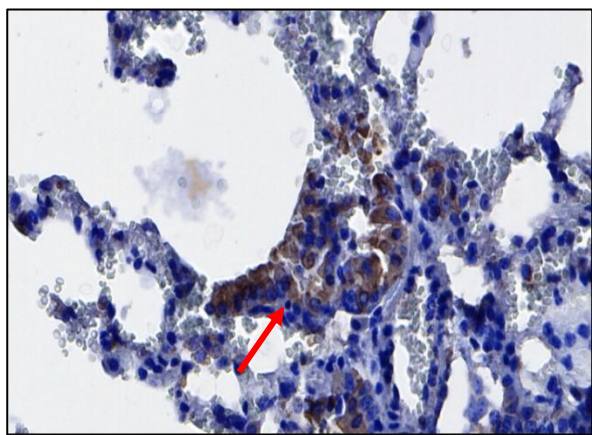


Рис.7. Увеличение x200. Лёгкие, 2 мес. введения препаратов. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелка) .2 группа (зараженные БЦЖ, с введением NaCl).

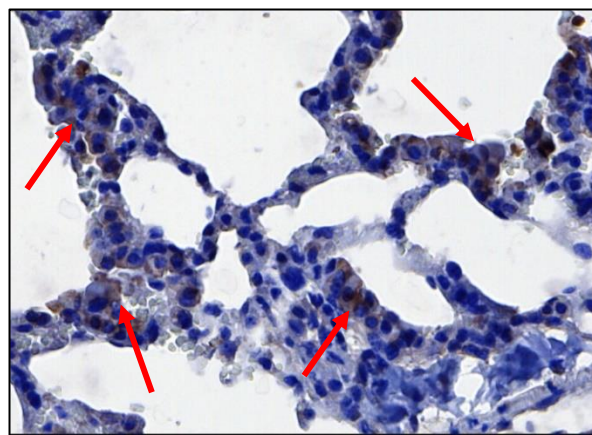


Рис. 8. Увеличение x200. Лёгкие, 2 мес. введения препаратов. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелки). 3 группа (зараженные БЦЖ, с введением изониазида)

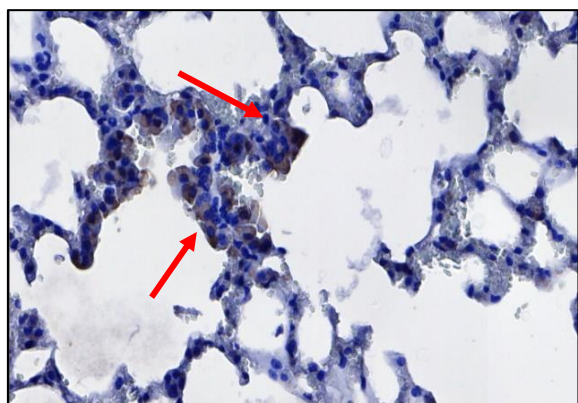


Рис. 9. Лёгкие, 2 мес. введения препаратов. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелки). 4 группа (зараженные БЦЖ, с введением декстразида).

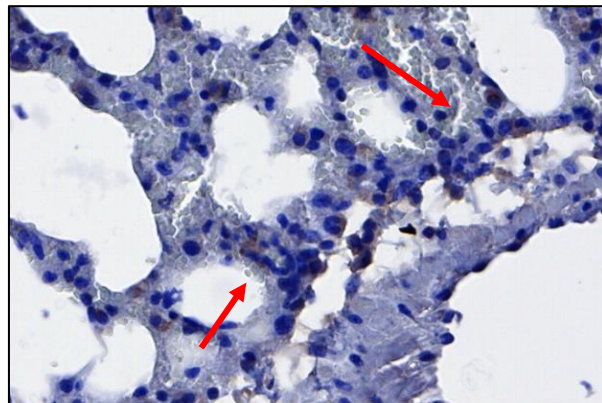


Рис. 10. Лёгкие, 2 мес. введения препаратов. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелки). 6 группа (зараженные БЦЖ, с введением ЛФД ингаляционно).

Очаги наиболее выраженной экспрессии этих белков располагались возле гранулём и скопления лимфоидных инфильтратов. После 6 месяцев введения препаратов изониазида в лёгких наблюдалось уменьшение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов во всех группах в два раза.

После 2 месяцев введения форм изониазида в печени животных, в основном внутри гранулём, обнаруживали очаги повышенной экспрессии TNF- $\alpha$  и IL-6, (рис. 11-14). Максимальный уровень TNF- $\alpha$  наблюдали у мышей в группе без лечения, IL-6 – у мышей в группе, получавшей изониазид. Минимальный уровень исследуемых цитокинов наблюдали в группах, получавших ЛФД разными способами.

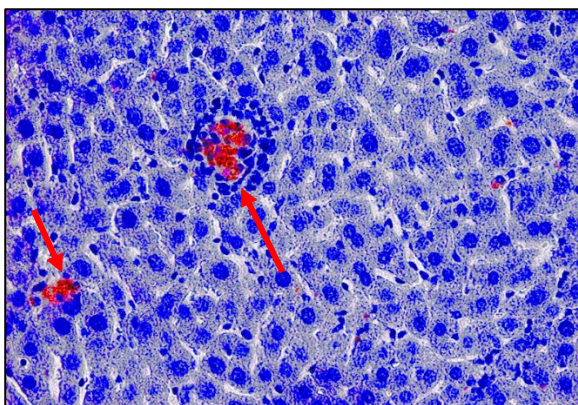


Рис. 11. Увеличение  $\times 200$ . Печень, 2 мес. введения препаратов. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелки). 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения).

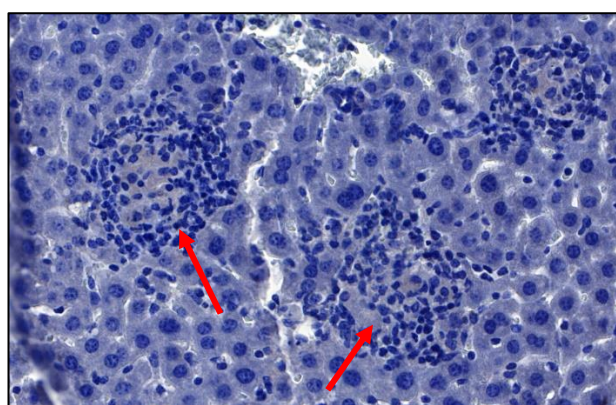


Рис.12. Увеличение  $\times 200$ . Печень, 2 мес. введения препаратов. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелка). 3 группа (зараженные БЦЖ, с введением изониазида).

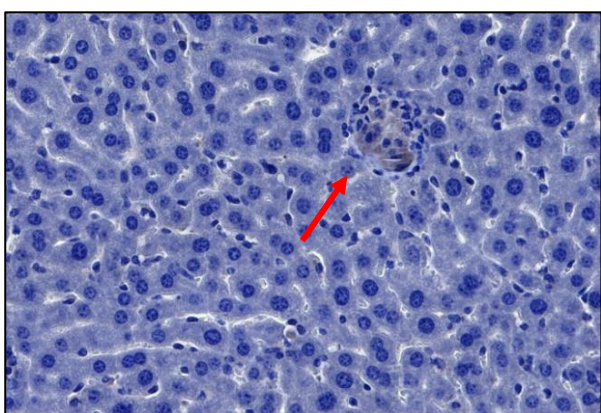


Рис.13. Увеличение  $\times 200$ . Печень, 2 мес. лечения. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелка). 4 группа (зараженные БЦЖ, с введением дексаметазона).

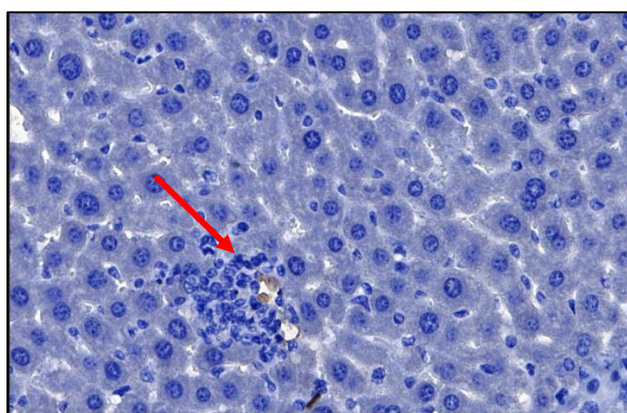


Рис.14. Увеличение  $\times 200$ . Печень, 2 мес. лечения. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . Экспрессия TNF- $\alpha$  (стрелки). 5 группа (зараженные БЦЖ, с введением ЛФД).

После 6 месяцев введения препаратов изониазида у мышей в группах без лечения и в группе мышей, получавших изониазид, уровень провоспалительных цитокинов нарастал, в то время как в группах мышей, получавших формы дексаметазона, особенно ЛФД, экспрессия TNF- $\alpha$  и IL-6 уменьшалась.

В лёгких мышей после 2 месяцев введения разных препаратов изониазида наибольшее количество инфильтратов и уровень металлопротеиназ было в группах животных, получавших изониазид и дексаметазид, а минимальное - в группах мышей, получавших ЛФД, причём ингаляционное введение ЛФД показало лучшие результаты, чем интраперитонеальное (рис. 15). Уровень TIMP1 в легких мышей во всех группах обратно коррелировал с уровнем MMP1.

После 6 месяцев введения разных форм изониазида наблюдалась сходная динамика изменений уровней инфильтратов, провоспалительных цитокинов и металлопротеиназ в легких мышей.

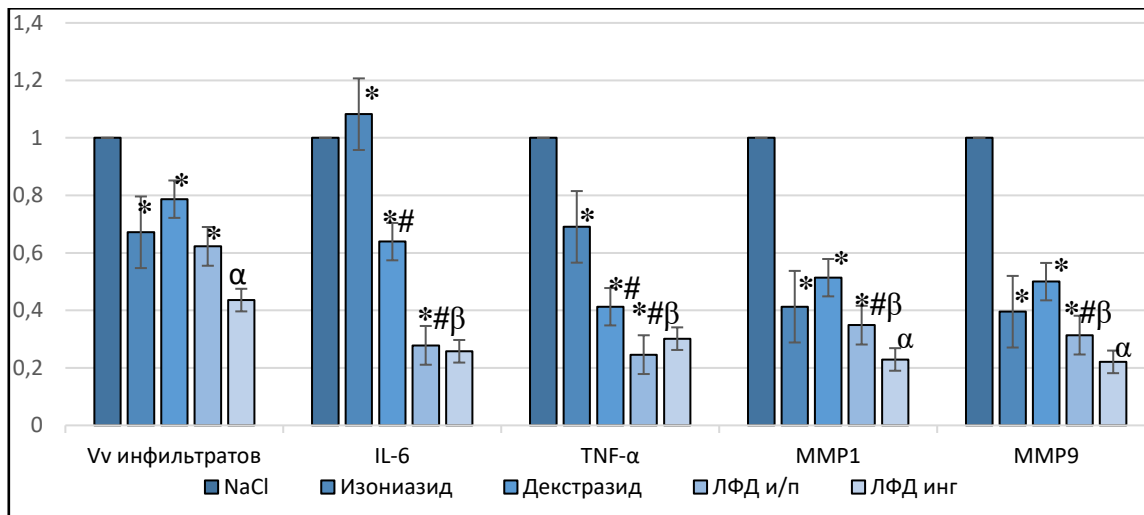


Рис. 15. Объемная плотность инфильтратов, уровни интерлейкинов IL-6, TNF- $\alpha$ , матричных металлопротеиназ MMP1 и 9 в легких мышей с БЦЖ-гранулематозом после 2 месяцев введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном.

Примечание. Результаты представлены в виде доли от величины показателя в группе с введением NaCl, принятой за единицу; Vv – объемная плотность. \* – достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших NaCl, # - достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших изониазид;  $\beta$  - достоверные различия между группами мышей, получавших декстразид и ЛФД;  $\alpha$ - достоверные различия между группами мышей, получавших ЛФД интраперитонеально и ингаляционно.

Динамика изменения уровня инфильтратов, MMP и TIMP1 в паренхиме печени после 2 и 6 месяцев введения мышам разных форм изониазида была сходной с таковой в паренхиме лёгких, за исключением различий между группами с интраперитонеальным и ингаляционным введением ЛФД; при исследовании печени достоверных различий между этими группами мышей не было обнаружено (рис. 16).

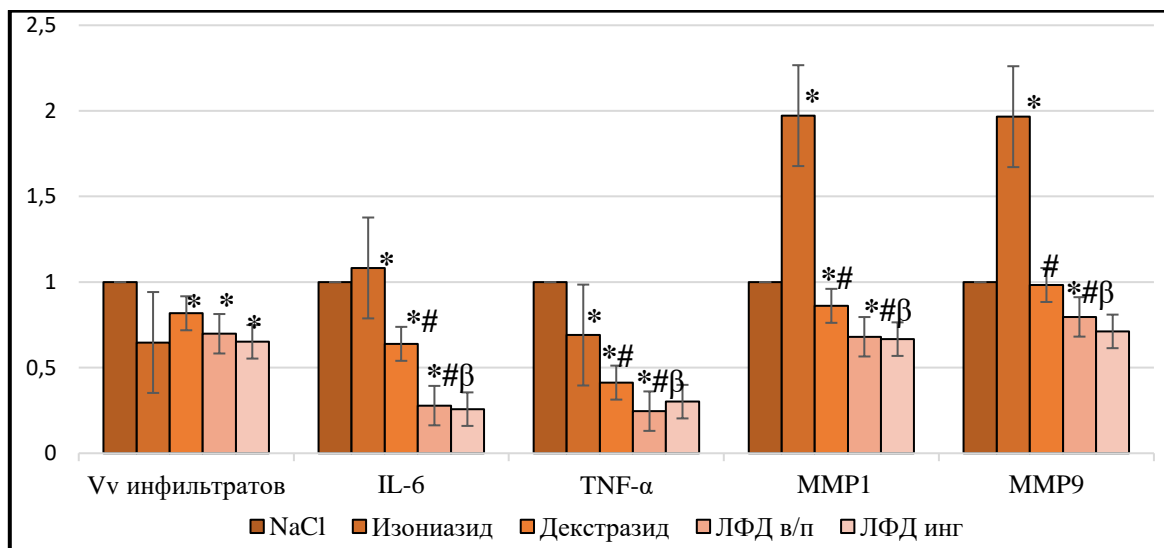


Рис. 16. Объемная плотность инфильтратов, уровни интерлейкинов IL-6, TNF- $\alpha$ , матричных металлопротеиназ MMP1 и 9 в печени мышей с БЦЖ-гранулематозом после 2 месяцев введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном.

Примечание. Результаты представлены в виде доли от величины показателя в группе с введением NaCl, принятой за единицу; Vv – объемная плотность. \* – достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших NaCl, # - достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших изониазид;  $\beta$  - достоверные различия между группами мышей, получавших декстразид и ЛФД;

Таким образом, полученные результаты указывают на уменьшение проявлений побочных эффектов изониазида в паренхиме лёгких и печени при применении ЛФД.

### **Уровень деструктивных нарушений, объемная плотность коллагеновых и ретикулярных волокон в легких и печени мышей с БЦЖ-гранулематозом после введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном**

Персистенция МБТ в тканях и воздействие фармацевтических композиций приводят к деструкции и фиброзированию тканей (Warsinske, 2017). После 2 месяцев введения форм изониазида минимальным уровень деструкции и фиброза в легких был у мышей в группах, получавших ЛФД (табл. 1).

Таблица 1. Уровень деструктивных нарушений, объемная плотность коллагеновых и ретикулярных волокон в лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом после введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном на различных сроках (2 и 6 месяцев) ( $M \pm m$ ).

Показатель	Группы животных с введением:			
	изониазида	декстразида	ЛФД и/п	ЛФД инг
2 месяца				
Деструктивные нарушения	0,46±0,74*	0,51±0,67*	0,38±0,62*#β	0,33±0,62
Объемная плотность коллагеновых волокон в паренхиме	1,33±0,15*	0,79±0,2*#	0,59±0,16*#β	0,49±0,09
Объемная плотность ретикулярных волокон в гранулёмах	1±0,3	0,59±0,16*#	0,49±0,15*#β	0,45±0,12α
6 месяцев				
Деструктивные нарушения	0,68±0,33*	0,62±0,32*	0,46±0,29*#	0,41±0,34
Объемная плотность коллагеновых волокон в паренхиме	1,2±0,98*	0,33±0,13*#	0,25±0,12*#	0,22±0,13α

Примечание. За единицу приняты величины показателей у мышей в группе с введением NaCl. \* – достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших NaCl, # - достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших изониазид; β - достоверные различия между группами мышей, получавших декстразид и ЛФД; α- достоверные различия между группами мышей, получавших ЛФД интраперитонеально и ингаляционно.

После 6 месяцев введения разных форм изониазида величины приведенных показателей демонстрировали сходную динамику; в лёгких количество коллагеновых и ретикулярных волокон в группе мышей, получавших изониазид, было максимальным, а в группе мышей, получавших ЛФД – минимальным.

В печени мышей после 2 месяцев лечения наблюдалась сходная гистологическая картина, минимальный уровень деструктивных нарушений и сниженное количество коллагеновых и ретикулярных волокон было у мышей в



группах, получавших ЛФД. Однако в печени более выражено проявлялся профибротический эффект изониазида; количество соединительнотканых волокон в печени мышей этой группы было значительно больше, чем во всех остальных группах, включая мышей, не получавших лечения.

Таблица 2. Уровень деструктивных нарушений, объемная плотность коллагеновых и ретикулярных волокон в печени мышей с БЦЖ-гранулематозом после введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном на различных сроках (2 и 6 месяцев).

Показатель	Группы животных с введением:			
	изониазида	декстразида	ЛФД и/п	ЛФД инг
2 месяца				
Деструктивные нарушения	1,1±0,04	0,74±0,01*	0,69±0,03*#	0,53±0,02 $\alpha$
Объемная плотность коллагеновых волокон в паренхиме	0,92±0,1	0,42±0,03*#	0,34±0,02*#	0,32±0,03
Объемная плотность ретикулярных волокон в гранулёмах	2±0,27*	1,5±0,24#	0,95±0,19 $\beta$ #	0,9±0,26
6 месяцев				
Деструктивные нарушения	0,64±0,04*	0,34±0,04*	0,19±0,01*#	0,18±0,01
Объемная плотность коллагеновых волокон в паренхиме	0,79±0,09	0,35±0,03*#	0,27±0,02*#	0,26±0,02
Объемная плотность ретикулярных волокон в гранулёмах	1,31±0,07	0,89±0,1#	0,71±0,14*#	0,62±0,14 $\alpha$

Примечание. За единицу приняты величины показателей у мышей в группе с введением NaCl. \* – достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших NaCl, # - достоверные различия по сравнению с группой мышей, получавших изониазид;  $\beta$  - достоверные различия между группами мышей, получавших декстразид и ЛФД;  $\alpha$ - достоверные различия между группами мышей, получавших ЛФД интраперитонеально и ингаляционно.

Таким образом, в работе показано, что изониазид, как стандартное средство для лечения туберкулёза, хорошо элиминировал персистирующие МБТ, особенно в свободных макрофагах, однако его приём сопровождался большим количеством деструктивных и фибротических изменений.

В паренхиме лёгких увеличивалась объемная плотность зон ателектазов и эмфиземы, а в печени – микронекрозов и зон гепатоцитов в состоянии гидропической

дистрофии. Введение препаратов увеличивало объёмную плотность коллагеновых волокон в паренхиме органов и ретикулярных волокон в гранулёмах.

К 6 месяцу введения препаратов уровни деструктивных нарушений, а также объёмные плотности коллагеновых волокон в паренхиме и ретикулярных волокон в гранулёмах, в печени и в лёгких были максимальными в группе мышей, получавших изониазид. Объёмная плотность воспалительных инфильтратов, расположенных преимущественно вокруг локусов деструкции и гранулём, и уровень экспрессии провоспалительных цитокинов, также были максимальным в группе мышей, получавших изониазид.

Ранее разработанный конъюгат изониазида с окисленным декстраном – декстразид, был не менее эффективен, чем изониазид в сокращении количества персистирующих микобактерий и гранулём, но его использование было связано с меньшим количеством побочных эффектов. В группе мышей, получавших декстразид, уровни провоспалительных цитокинов, коллагеновых волокон в паренхиме органов и ретикулярных волокон в гранулёмах к 6 месяцу введения препаратов были достоверно ниже, чем в группе мышей, получавших изониазид.

Можно предполагать, конъюгация изониазида с окисленным декстраном увеличивает молекулярную массу препарата и благодаря этому лучше захватывается макрофагами и дольше остаётся внутри (Шкурупий В.А., Козяев М.А., 2006). Свободные макрофаги, захватившие МБТ и декстразид, активно встраиваются в гранулёмы и, сливаясь между собой, высвобождают в центр гранулёмы декстразид. Этот механизм позволяет доставить фармацевтическую композицию в бессосудистую зону – центр гранулёмы, являющуюся местом наибольшей концентрации МБТ.

Разработанная липосомальная форма декстразида показала наилучший эффект среди всех исследованных фармацевтических композиций, элиминируя МБТ так же эффективно, как и изониазид, но с гораздо меньшими побочными эффектами, чем изониазид и декстразид.

Уровни провоспалительных цитокинов, объёмная плотность инфильтратов, деструктивных и фибротических изменений были минимальными в группах мышей, получавших ЛФД различными способами. Можно предполагать, что помещение декстразида в липосомы увеличивает их захват макрофагами, уменьшая неспецифическое воздействие препарата на паренхиму органов (Шкурупий В.А., 2016). Кроме того, помещение декстразида в липосомы дало возможность вводить его ингаляционно, при этом ингаляционная форма ЛФД показала наивысшую эффективность в элиминации МБТ из лёгких с наименьшими повреждениями паренхимы органа.

## ВЫВОДЫ

1. Морфологическая картина лёгких и печени после девятимесячного инфицирования мышей БЦЖ соответствовала хронической туберкулёзной инфекции: в паренхиме печени обнаружены гранулёмы и персистирующие в них микобактерии, что сопровождалось воспалительными и деструктивными изменениями в тканях.

2. Через 2 месяца после начала введения изониазида и композиций изониазида с окисленным декстраном снизилось общее количество МБТ в лёгких и печени, объемная и численная плотность гранулём; через 6 месяцев – в паренхиме лёгких всех групп мышей МБТ не обнаружили, в печени – отмечено дальнейшее снижение величин показателей, при этом декстразид проявил большую по сравнению с изониазидом эффективность в элиминации микобактерий, персистирующих в печени, и одинаковую – в элиминировании микобактерий, персистирующих внутри отдельных макрофагов и макрофагов гранулём, в лёгких.

3. Декстразид показал меньшую токсичность по сравнению с изониазидом, что проявилось меньшим объемом воспалительных и деструктивных изменений паренхимы легких и печени на исследуемых сроках; максимальные отличия были обнаружены после шести месяцев приёма, при этом уровень деструктивных изменений при использовании изониазида был в два раза выше, чем у мышей, получавших декстразид.

4. Уровень фиброзных изменений в легких и печени при введении декстразида был ниже, чем у животных, получавших изониазид; к шестому месяцу введения декстразида в два раза снижалась объемная плотность коллагеновых и ретикулярных волокон в гранулёмах и в интерстиции.

5. Липосомальная форма декстразида оказалась более эффективной в уничтожении персистирующих микобактерий и элиминации гранулём; через 6 месяцев после начала её введения общее количество МБТ в печени уменьшилось в 1,8 и 1,5 раза по сравнению с использованием изониазида и декстразида, что повлекло за собой уменьшение размера и количества гранулём в печени в 1,5 и 1,4 раза соответственно.

6. Липосомальная форма декстразида оказывала меньшее токсическое действие на лёгкие и печень мышей с БЦЖ-гранулематозом по сравнению с изониазидом и декстразидом; при ее использовании в течение 6 месяцев уровень воспаления в лёгких был в 3 и 2 раза, а в печени – в 7 и 2,5 раза ниже соответственно; количество деструктивных изменений в лёгких и печени при использовании липосомальной формы декстразида было также ниже, в лёгких – в 1,5 и 1,4 раза, а в печени – в 3,5 и 2 раза по сравнению с использованием изониазида и декстразида соответственно.

7. Использование липосомальной формы декстразида привело к уменьшению объёма коллагеновых и ретикулярных волокон в структуре гранулём и паренхимы лёгких и печени мышей по сравнению с животными, которым вводили изониазид; через 6 месяцев количество коллагеновых волокон в лёгких было меньше в 2,3 раза,

в печени – в 3 раза; количество ретикулярных волокон в легких и в печени было меньше в 2 раза.

8. Ингаляционное введение липосомальной формы декстразида на 20% эффективнее уничтожало микобактерии, персистирующие в лёгких, чем интраперитонеальное введение, сохраняя при этом сходную эффективность в отношении микобактерий в печени; токсичность препарата при разных способах введения оставалась сходной.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в журналах, рекомендованных ВАК**

1. Sinyavskaya, A.M. Location of Pulmonary Mycobacteria Tuberculosis and Effectiveness of Various Dextrazide Compositions in Treatment of Mice with BCG-Induced Granulomatosis / A.M. Sinyavskaya, A.V. Troitskiy, A.M. Kovner, V.A. Shkurupy // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 169, No. 1. – P. 63-66. – DOI:10.1007/s10517-020-04825-6. (**WoS, Scopus**).
2. Sinyavskaya, A.M. Analysis of the Efficiency of Different Antituberculous Drugs and Approaches to Treat BCG-Induced Granulomatosis in Mice and Abundance and Localization of Mycobacterium tuberculosis in the Liver / A.M. Sinyavskaya, A.V. Troitskii, A.M. Kovner, V.A. Shkurupy // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 170, No. 2. – P. 233-235. – DOI 10.1007/s10517-020-05041-y. (**WoS, Scopus**).
3. Shkurupy, V.A. Destructive Processes and Fibrotic Complications in the Liver of Mice with BSG-Induced Granulomatosis Treated with Anti-Tuberculous Drugs / V.A. Shkurupy, A.M. Sinyavskaya, A.V. Troitskii // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – Vol. 170, No. 4. – P. 466-470. – DOI 10.1007/s10517-021-05089-4. (**WoS, Scopus**).

### **Материалы конференций**

4. Сиявская, А.М. Структурные изменения в печени мышей линии BALB/C при лечении БЦЖ-гранулематоза молекулярной наносомальной фармацевтической композицией на основе окисленного декстрана / А.М. Сиявская, А.В. Ковнер, А.В. Троицкий, Т.Н. Быстрова, В.А. Шкурупий // Тезисы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов. – 2018. – С. 155.
5. Сиявская, А.М. Влияние наносомальной фармацевтической композиции на основе окисленного декстрана на структуру печени и лёгких мышей линии BALB/C с БЦЖ-гранулематозом / А.М. Сиявская // Материалы III Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная

основа медицины», посвященной 100-летию профессора Т.Д. Никитиной. – 2018. – С. 195-197.

6. Синявская, А.М. Размеры туберкулёзных гранулём как показатель количества микобактерий и эффективности противотуберкулёзных средств / А.М. Синявская // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Девятой Всероссийской научно-практической конференции 22–24 сентября 2020 г., г. Новосибирск. Под ред. М.И. Воеводы. Мин-во науки и высшего образования РФ, ФИЦ ФТМ. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2020. – 160 с.
7. Синявская А.М. Влияние матриксных протеиназ и тканевых ингибиторов матриксных протеиназ на патогенез БЦЖ-гранулематоза / А.М. Синявская // Материалы VI съезда Российского общества патологоанатомов, Новосибирск, 08–10 июня 2022 г. – Новосибирск: М: Группа МДВ, 2022. – 225 с.
8. Синявская А.М. Исследование фибротических изменений в печени мышей с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида / А.М. Синявская // Материалы XIV Российской научно-практической конкурсно-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2023». – С. 176.

### СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БЦЖ – бацилла Кальмета-Герена (*Mycobacterium bovis BCG*);

ГИНК – гидразид изоникотиновой кислоты;

ИГХ – иммунногистохимия;

ЛФД – липосомальная форма декстразида;

МБТ – микобактерия туберкулёза (*Mycobacterium tuberculosis*)

ММП – матриксная металлопротеиназа;

ТИМР1 - Tissue inhibitor metalloproteinase 1 (тканевый ингибитор металломатриксной протеиназы 1);

ИЛ-6 – Интерлейкин-6.

TNF- $\alpha$  – Tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли).

Соискатель

А.М. Синявская